

520.42819X00

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant(s): KAKIBAYASHI, et al.
Serial No.: Not assigned
Filed: July 18, 2003
Title: BIO ELECTRON MICROSCOPE AND OBSERVATION METHOD
OF SPECIMEN
Group: Not assigned

LETTER CLAIMING RIGHT OF PRIORITY

Mail Stop Patent Application
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

July 18, 2003

Sir:

Under the provisions of 35 USC 119 and 37 CFR 1.55, the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on Japanese Application No.(s) 2003-002724 filed January 9, 2003.

A certified copy of said Japanese Application is attached.

Respectfully submitted,

ANTONELLI, TERRY, STOUT & KRAUS, LLP



Marvin Kraus

Registration No. 22,466

MK/amr
Attachment
(703) 312-6600

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2003年 1月 9日

出 願 番 号

Application Number:

特願2003-002724

[ST.10/C]:

[JP2003-002724]

出 願 人

Applicant(s):

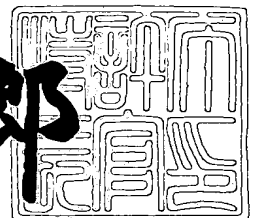
株式会社日立製作所

株式会社日立ハイテクノロジーズ

2003年 4月25日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3029821

【書類名】 特許願

【整理番号】 H02015211A

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 H01J 37/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

【氏名】 柿林 博司

【発明者】

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

【氏名】 細木 茂行

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市戸塚区吉田町 2 9 2 番地 株式会社日立製作所生産技術研究所内

【氏名】 高木 裕治

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県土浦市神立町 5 0 2 番地 株式会社日立製作所機械研究所内

【氏名】 三宅 亮

【発明者】

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

【氏名】 中村 邦康

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 株式会社日立ハイテクノロジー設計・製造統括本部那珂事業所内

【氏名】 佐藤 貢

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市大字市毛 882 番地 株式会社日立
ハイテクノロジーズ設計・製造統括本部那珂事業所内

【氏名】 小林 弘幸

【特許出願人】

【識別番号】 000005108

【氏名又は名称】 株式会社 日立製作所

【特許出願人】

【識別番号】 501387839

【氏名又は名称】 株式会社 日立ハイテクノロジーズ

【代理人】

【識別番号】 100075096

【弁理士】

【氏名又は名称】 作田 康夫

【電話番号】 03-3212-1111

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013088

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 バイオ電子顕微鏡及び試料の観察方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

加速した電子線を収束あるいは平行にして試料へ照射する電子線照射系と、試料を透過した電子あるいは試料表面から放出される 2 次電子や反射電子を検出して拡大像を得る結像系から成る電子顕微鏡において、電子線の試料透過限界加速電圧又は所定の条件下で求めた電子線の試料透過限界加速電圧の1.2~4.2倍の加速電圧で前記試料を観察することを特徴とするバイオ用電子顕微鏡による観察方法。

【請求項 2】

前記試料透過限界加速電圧は、前記試料の観察視野あるいは接近する視野を30 kV以下の低加速電圧で、かつ複数種の加速電圧で撮影する工程、それらの画像の解像度やコントラストなどの像質を比較する工程、試料透過限界加速電圧を決定する工程により求めることを特徴とする請求項 1 記載のバイオ用電子顕微鏡による観察方法。

【請求項 3】

前記試料に照射する電子線の加速電圧を所望値に設定するために、その加速電圧に最適な電子銃のエミッション電流、照射系、結像系レンズの励磁電流又は電子線絞り位置の少なくとも一つをレシピとして制御用コンピュータに保持することを特徴とする請求項 1 記載のバイオ用電子顕微鏡。

【請求項 4】

画像解析部および画像表示部において、前記試料に含まれるウイルスや蛋白質などの観察像又は観察像と既知のウイルスや蛋白質などの参照像又は参照像の類似性を画像処理ソフトを用いて定量解析することにより、前記試料中のウイルスや蛋白質などの種類又は物質の種類を同定し、該結果を表示することを特徴とする請求項 1 記載のバイオ用電子顕微鏡。

【請求項 5】

試料ステージ部にMEMS (Micro Electro Mechanical Systems)技術を用いた

チップ状の試料前処理装置を搭載することを特徴とする請求項 1 記載のバイオ用電子顕微鏡。

【請求項 6】

加速した電子線を収束あるいは平行にして試料へ照射する電子線照射系と、試料を透過した電子あるいは試料表面から放出される 2 次電子や反射電子を検出して拡大像を得る結像系から成る電子顕微鏡において、電子線の試料透過限界加速電圧又は所定の条件下で求めた電子線の試料透過限界加速電圧に対して、染色切片試料の場合は 1.2～4.2 倍、ネガティブ染色試料の場合は 1.6～3.5 倍、凍結切片試料の場合は 2.0～3.0 倍の加速電圧で前記試料を観察することを特徴とするバイオ用電子顕微鏡による観察方法。

【請求項 7】

前記試料透過限界加速電圧は、試料の観察視野あるいは接近する視野を 30kV 以下の低加速電圧で、かつ複数種の加速電圧で撮影する工程、それらの画像の解像度やコントラストなどの像質を比較する工程、試料透過限界加速電圧を決定する工程により求めることを特徴とする請求項 6 記載のバイオ用電子顕微鏡による観察方法。

【請求項 8】

前記試料に照射する電子線の加速電圧を所望値に設定するために、その加速電圧に最適な電子銃のエミッション電流、照射系、結像系レンズの励磁電流又は電子線絞り位置の少なくとも一つをレシピとして制御用コンピュータに保持することを特徴とする請求項 6 記載のバイオ用電子顕微鏡。

【請求項 9】

画像解析部および画像表示部において、前記試料に含まれるウイルスや蛋白質などの観察像又は観察像と既知のウイルスや蛋白質などの参照像又は参照像の類似性を画像処理ソフトを用いて定量解析することにより、前記試料中のウイルスや蛋白質などの種類又は物質の種類を同定し、該結果を表示することを特徴とする請求項 6 記載のバイオ用電子顕微鏡。

【請求項 10】

試料ステージ部に MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術を用いた

チップ状の試料前処理装置を搭載することを特徴とする請求項6記載のバイオ用電子顕微鏡。

【請求項11】

加速した電子線を収束あるいは平行にして試料へ照射する電子線照射系と、試料を透過した電子あるいは試料表面から放出される2次電子や反射電子を検出して拡大像を得る結像系から成る電子顕微鏡において、E×B型エネルギーフィルタを試料を透過した電子線を検出する電子線検出器と試料の間に設けたことを特徴とするバイオ用電子顕微鏡。

【請求項12】

前記試料に照射する電子線の加速電圧を所望値に設定するために、その加速電圧に最適な電子銃のエミッション電流、照射系、結像系レンズの励磁電流又は電子線絞り位置の少なくとも一つをレシピとして制御用コンピュータに保持することを特徴とする請求項11記載のバイオ用電子顕微鏡。

【請求項13】

画像解析部および画像表示部において、前記試料に含まれるウイルスや蛋白質などの観察像又は観察像と既知のウイルスや蛋白質などの参照像又は参照像の類似性を画像処理ソフトを用いて定量解析することにより、前記試料中のウイルスや蛋白質などの種類又は物質の種類を同定し、該結果を表示することを特徴とする請求項11記載のバイオ用電子顕微鏡。

【請求項14】

試料ステージ部にMEMS (Micro Electro Mechanical Systems)技術を用いたチップ状の試料前処理装置を搭載することを特徴とする請求項11記載のバイオ用電子顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、電子線を試料に照射して、試料を透過した電子あるいは試料表面から放出される2次電子や反射電子を検出して拡大像を得る電子顕微鏡装置に係わり、特にバイオ用に係わる。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

電子顕微鏡を用いて特にバイオ試料を観察する目的としては、生体組織の微細構造解析、蛋白質の構造解析やウイルスの検査などがある。最近では、狂牛病(BSE)、HIVやHICなどの感染症、O157による食中毒、炭疽菌テロなど様々な疾患が増大し、電子顕微鏡を用いた高倍率像観察による信頼性の高い解析や検査へのニーズが増大している。注目するウイルスや蛋白質が微細で高分解能が必要であったり、内部構造を観察したい時には、試料を透過した電子で結像する透過電子顕微鏡(TEM; Transmission Electron Microscope)が用いられる。バイオ用の透過電子顕微鏡に関しては、例えば(株)日立ハイテクノロジーズのH-7600透過電子顕微鏡カタログ No.HTD-040(2001.11発行)に記載されている。電子銃、照射系電子レンズ、試料ホルダ・ステージ、結像系電子レンズ、カメラ、真空排気系、制御系などから構成される。バイオ用製品の電子線加速電圧は100kVと120kVが主流であり、50kV程度まで下げて使用する場合もある。透過電子顕微鏡によるバイオ試料の観察手順については、例えば「電子顕微鏡」, Vol.37, No2, p.81-84 (2002)に記載されている。ウイルスの検査では、食中毒の原因である数十nm直径の小型球形ウイルスを糞便から精製・濃縮し、数万倍から数十万倍の拡大像を観察し、形状や内部構造の特徴からウイルスの有無やウイルスの種類を判定している。また、蛋白質の構造解析では、生物組織から抽出・精製された蛋白質試料を、電子顕微鏡の試料ステージを傾斜しながら何枚も拡大像を撮影し、それらの画像をCT(Computed Tomography)処理することによって、数十nmの微細立体構造が得られている。

透過電子顕微鏡で観察するバイオ試料は、①染色切片試料、②ネガティブ染色試料、③凍結切片試料の3種類に大別される。染色切片試料は、動植物の生体組織をダイヤモンドやガラスの刃を装備したミクロトームを用いて厚さ数十nmの切片にして、電子顕微鏡用のメッシュに載せたものである。切片にする際には、生体組織の固定、脱水、包埋、切削などのプロセスがある。電子顕微鏡像で組織構造に対応したコントラストを得るためには一般に試料への染色が必要である。染色剤には酢酸ウラン、クエン酸鉛、水酸化鉛、酢酸鉛などの重金属を含む試薬を用

いる。通常はウランと鉛で2重染色する。染色が必要な理由は、生体を構成する主な元素が水素、酸素、炭素、窒素など軽元素であるため電子線に対する散乱能とその元素間差が小さく、像コントラストが極めて付きにくいからである。染色されるのは組織中の蛋白質であり、蛋白質の濃度が高いほど強く染色されるので、結果として電子顕微鏡像には蛋白質濃度に依存したコントラストが得られる。

②ネガティブ染色試料は、生体組織や糞便などを試薬や遠心分離機を用いて精製、濃縮したものを電子顕微鏡用のメッシュに載せたものである。ウイルスなどの微粒子状試料が代表例である。染色剤としては一般には隣タンゲステン酸(PTA)液が用いられる。この方法では、ウイルスの場合には、ウイルスの周囲に染色剤の土手が形成されることにより、土手とウイルスの間でコントラストが形成されることになる。③凍結切片試料は、生体組織を液体ヘリウムや液体窒素で冷却した銅ブロックに接触させて瞬時に凍結させ、冷却ステージを装備したマイクロトームを用いて凍結した状態のまま切削したものである。活性状態の組織構造観察が目的であり、固定や染色は行わず、かつ観察には冷却試料ステージを装備したクライオ電子顕微鏡を用いる。染色しないので、像のコントラストは極めて低い。

最近の透過電子顕微鏡は、焦点合わせ、写真撮影、試料微動などの操作を容易にするためにレンズ電流、シャッター、試料ステージなどがPC(パーソナルコンピュータ)で制御され、オートフォーカス、オートフォト、オートモンタージュ(試料微動と撮影を自動的に繰り返して、繋ぎ合わせた広視野像を得る)などの機能が搭載されている。試料を電子顕微鏡で観察できるようにするまでの抽出、精製、濃縮、染色などの試料前処理、および撮影した画像からウイルスの種類や蛋白質立体構造を解析する機能は、電子顕微鏡には搭載されていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

透過電子顕微鏡で観察するバイオ試料は、電子線照射によるダメージを受けやすいという問題がある。生体組織を構成する成分は約85%が水であるが、他に10%の蛋白質、2%の脂肪、1.5%の無機物、1.1%の核酸などから成り、これらが電子線照射に対して弱い。このような構成から成る生体組織の試料に加速電圧100-12

0keVの電子線を照射した時に、微細構造の変形、変質、破壊などのダメージが発生する。重金属で染色されている染色切片試料とネガティブ染色試料は、凍結切片試料と比較して電子線照射には多少強いが、本質的な問題として避けることはできない。ダメージによって、バイオ微細構造を正確に解析できなかったり、検査の精度が低下したりする。特に細胞組織などの立体構造を3次元観察する際には、試料の同一視野を試料傾斜しながら何十回も像撮影するので、電子線照射量が非常に大きくなり、ダメージが顕著になる。この場合には、撮影中に構造が徐々に変化するので、各傾斜角度の像は同一構造を反映していないことになる。それらの像を用いて立体構築の画像処理を行うとアーティファクトが発生し、正確な立体構造が得られない。

また、上記の様にバイオ試料は染色しないと高コントラストが得られないことも問題である。染色によって微細構造が変化する場合があるし、染色した試料を用いて観察された構造が本来の構造とどのように対応しているか分からない場合がある。これらも誤った解析や検査精度の低下をもたらす。

従来の電子顕微鏡は基本的に微細構造の拡大像を観察するものであり、像の解釈、すなわち必要な情報を抽出することはユーザが行わなければならない。電子顕微鏡による代表的な病理診断としてはウイルス性疾患の特定が挙げられる。電子顕微鏡で観察されたウイルス像の構造的な特徴からウイルスの種類を特定する。それには高度な知識と経験が必要であり、限られた研究者にしか実施できない。最近の電子顕微鏡は画像処理ソフトを搭載しているので、CCDカメラで撮影した画像を高速フーリエ変換して周波数成分解析したり、粒子分布を解析したりすることはできるが、ユーザが必要な情報を抽出するためのサポート的な位置付けに過ぎない。

さらに、バイオ試料の前処理についても、上記の様に生体組織の固定、脱水、包埋、切削、染色などの多数のプロセスを手作業で長時間かけて行うという課題がある。しかも、生体試料毎に、目的とする組織構造毎に各プロセスを最適化する必要があり、高度な技術、ノウハウ、経験を要する。前処理条件のバラツキによって、同一の生体組織であっても全く異なった電子顕微鏡像が観察されることも有り得る。

【 0 0 0 4 】

上述の問題点に鑑み、本発明はバイオ試料を低ダメージ、高コントラストで観察し、高精度な像解析を行い、かつ高スループットな試料前処理を行うバイオ電子顕微鏡及び観察方法を実現することを目的とする。

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成する手段として、以下のものを挙げる。

(1) 電子線照射によるバイオ試料へのダメージを低減するために、所定の条件下で求めた電子線の試料透過限界加速電圧の1.2~4.2倍の加速電圧で観察する方法を用いる。特に走査形透過電子顕微鏡(STEM; Scanning Transmission Electron Microscope)を用いると、従来のバイオ用の透過電子顕微鏡と比較して対物レンズの色収差の像への影響が無いので、より低加速電圧での観察が可能になり有利である。これによって、従来のバイオ電顕の加速電圧100~120kVと比較して1/10以下の低加速電圧で観察できるのでダメージを大幅に低減できる。バイオ試料の前処理方法が既知である場合には、染色切片試料については1.2~4.2倍、ネガティブ染色試料については1.6~3.5倍、凍結切片試料については2.0~3.0倍の加速電圧で観察する。試料透過限界加速電圧は、試料の観察視野あるいは接近する視野を30kV以下の低加速電圧で、かつ複数種の加速電圧で撮影する工程、それらの画像の解像度やコントラストなどの像質を比較する工程、試料透過限界加速電圧を決定する工程により求める。また、試料に照射する電子線の加速電圧を任意に設定するために、各加速電圧に最適な照射系および結像系レンズの励磁電流や電子線絞り位置をレシピとして電子顕微鏡の制御用コンピュータに保持する。

(2) バイオ試料を高コントラスト観察するために、E×B型エネルギーフィルタを試料を透過した電子線を検出する電子線検出器と試料の間に設ける。ここで用いるE×B型エネルギーフィルタは、10mm角程度の静電偏向用電極と磁界偏向用磁極から成る小型のものであり、従来の走査形透過電子顕微鏡や走査電子顕微鏡(SEM; Scanning Electron Microscope)に容易に設置できる。電子線の加速電圧が10kV程度であれば、1kV以下の偏向電圧、1A以下の偏向電流を印加して、バイオ試料を透過した電子線をエネルギー選別できる。250eV付近の損失エネルギー

ーを有する電子線を選別して結像すると、試料包埋樹脂や試料に広範囲に含まれるカーボンの影響を取り除き像を高コントラスト化できる。

(3) バイオ試料の電子顕微鏡像からの情報抽出、とくにウイルスの種類を特定するために、画像処理を用いる。種類が既知であるウイルスの電子顕微鏡像を参照像とし、試料を観察して得られたウイルス像を観察像とし、微細構造がどの程度似ているかを画像処理によって定量的に比較する。規定の範囲で似ていれば参照像と同一種類のウイルスであると判定する。画像処理には、相関法や周波数成分を特徴パラメータとするパターン認識法などを用いる。

(4) バイオ試料の前処理を高スループット化かつ自動化するために、前処理工程を実行するマイクロチャンバ、マイクロポンプ、マイクロ流路などをMEMS(Micro Electro Mechanical Systems)技術を用いてチップ上に形成したマイクロ試料前処理装置を電子顕微鏡に搭載する。該マイクロ試料前処理装置は電子顕微鏡の試料ステージ駆動系部分に着脱する機構とする。該マイクロ試料前処理装置で一連の試料前処理工程と処理後試料を電子顕微鏡用メッシュに載せる工程を実施した後に、電子顕微鏡用メッシュ搬送機構により電子顕微鏡用試料ホルダーに載せ換え、電子顕微鏡試料室に移動して観察に供する。

【 0 0 0 6 】

【発明の実施の形態】

以下に、本発明の実施の形態を説明する。

【 0 0 0 7 】

図1は、本発明によるバイオ電子顕微鏡及び観察方法を用いて観察した走査形透過電子顕微鏡像(STEM像)である。試料はアラビドプス(植物)の染色切片試料であり、試料厚さは100nmである。図1(a)は最適加速電圧10kVの入射電子線で、図1(b)は試料透過限界加速電圧3kVの入射電子線で観察した(試料透過限界加速電圧および最適加速電圧の定義については後述する)。前者は、加速電圧100kVクラスの従来のバイオ用透過電子顕微鏡(TEM)と比較して、解像度やコントラストなど全く遜色の無い像質が得られている。すなわち、入射電子線のエネルギーを1/10以下にして試料へのダメージを大幅に低減できると同時に、像質については高品質を保持できている。これは、電子線照射によりダメージを受け易いバイオ試

料にとって、極めて有効な観察方法を提供していることになる。従来のバイオ試料で問題となっていた、バイオ微細構造の変形、変質、破壊などのダメージを1/10以下に低減することができ、微細構造の正確な解析や、高精度な病理検査を行える。一方、後者(図1(b))は、解像度、コントラストとも著しく劣化している。これは入射電子線のエネルギーが低過ぎて、試料を殆ど透過できていないことに起因する。

【0008】

【表 1】

表 1

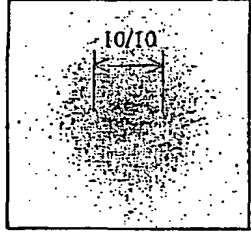
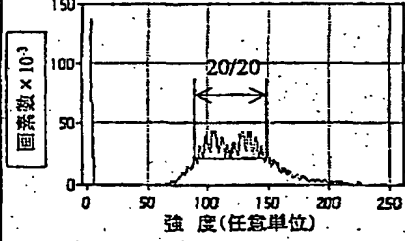
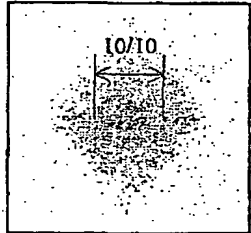
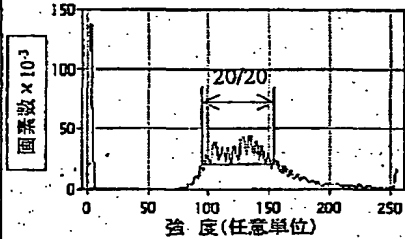
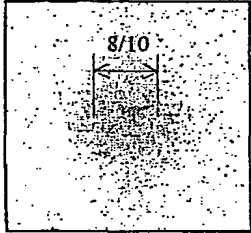
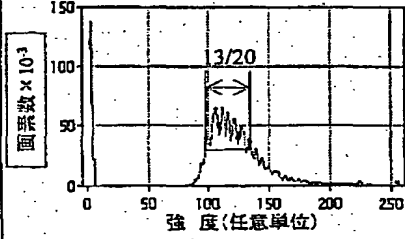
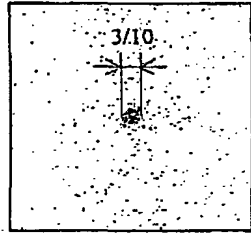
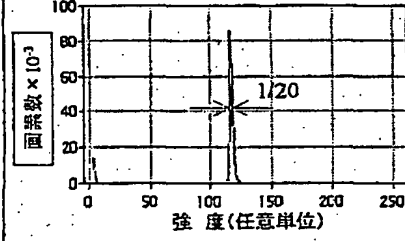
加速電圧	解像度(像中心部分のFFT)	コントラスト
30kV		
10kV		
5kV		
3kV		

表 1 は、様々な電子線加速電圧でアラビドプス(植物)の染色切片試料を観察し、解像度とコントラストの加速電圧依存性を纏めたものである。解像度の欄に示したデータは図 1 (a)に□(白抜き)の正方形図形で示した領域の高速フーリエ変換(FFT)像であり、矢印範囲で示した直径が像の最大空間周波数すなわち分

解能の逆数に比例する。数値が大きいほど解像度が高い。コントラストの欄に示したデータは、像を構成する各画素における強度(任意単位)の分布を画素数で表したものであり、矢印範囲で示したピーク半値幅がコントラストに対応する。数値が大きいほど様々な強度で画像が形成されていることになりコントラストが良好である。試料透過限界加速電圧は、加速電圧30kVで観察した像に対して、解像度が3/10あるいはコントラストが1/20に低下している時の加速電圧と定義する。また、最適加速電圧は加速電圧30kVで観察した像と同程度の解像度とコントラストが得られる最小の加速電圧と定義する。

【 0 0 0 9 】

【表 2】

表2

試料	試料透過 限界加速電圧(a)	最適加速電圧(b)	係数m(b/a)
アラビドプス(100nm厚)	3.0kV	7.5kV	2.5
マウス(100nm厚)	3.5kV	9.0kV	2.6
マウス(300nm厚)	5.5kV	14.0kV	2.5

表 2 は、生体組織の種類と切片の厚さが異なるバイオ試料について観察した際の、試料透過限界加速電圧と最適加速電圧、および最適加速電圧と試料透過限界加速電圧の比を係数 m として示したものである。係数 m は、生体組織の種類や切片の厚さには依存せず、ほぼ 2.5 の一定値を持つことが分る。この係数 m はバイオ試料の成分や前処理法および観察視野によって変動する。試料透過限界加速電圧はバイオ試料に対する電子線の透過能に比例し、透過能は電子線の侵入深さに比例する。最大侵入深さ R は Kanaya and Okayama の式 (K. Kanaya and S. Okayama; J. Phys. D: Appl. Phys. 5 (1972) 43) より、

$$R(\text{cm}) \cong 2.76 \times 10^{-11} A V^{5/3} / \rho Z^{8/9} \quad \dots \quad (\text{数式 1})$$

ここで、 A : 原子量, ρ : 密度, Z : 原子番号, V : 電子線加速電圧。

【0010】

【表3】

表3

試料	染色切片試料	ネガティブ染色試料	凍結切片試料
成分元素	C(53%),O(23%), N(16%),H(7%),S(2%)	同左	H(49.7%),O(24.9%), C(24.9%),N等
染色元素	Pb, U	W	なし(無染色)
染色元素の 平均原子番号	87	74	-
染色元素の 平均原子量	222.5	184	-
視野による 密度変動	±60%	±30%	なし
係数mの範囲	1.2~4.2	1.6~3.5	2.0~3.0

表3は、3種類に大別される試料前処理法について各パラメータをまとめたものである。成分元素は生体組織の種類には殆ど依存しない。従って、生体組織をそのまま凍結させて切削した凍結切片試料の場合は、生体の成分元素にほぼ等しい。一方、染色切片試料とネガティブ染色試料の場合には、脱水処理や置換処理が施されるので蛋白質の成分にほぼ等しい。染色元素は染色切片試料の場合は鉛(元素記号Pb)とウラン(元素記号U)、ネガティブ染色試料の場合はタンゲステン(元素記号W)であり、凍結切片試料の場合は無染色なので染色元素は無い。また、染色切片試料の場合に電子顕微鏡で観察する視野はユーザが注目する微細構造によって決まるが、染色元素の存在率(密度)は微細構造における蛋白質の濃度分布に依存する。従って、視野にどのような微細構造が入っているかによって±60%程度の密度変動が有り得る。ネガティブ染色試料の場合は生体組織が直接染色されているのではなく、ウイルス等の周囲に染色剤の土手が形成されている状態なので、染色元素の存在率(密度)の変動は染色切片試料の1/2程度の±30%程度になる。凍結切片試料の場合は染色元素が無いので、視野による変動も無い。以上のことから、数式1を用いて一定の最大侵入深さRを与える最大と最小加速電圧の比を求め、係数mの範囲を実験値2.5を中心に実験値誤差±20%を考慮して決定し

た。各前処理法による試料において、表3の最下段に示したように決定できた。これより、試料前処理法が既知である場合には、それに適した最適加速電圧の選択が可能である。また、試料前処理法が未知である場合には、係数 m として1.2～4.2を選択すれば全バイオ試料に対応できる。

【0011】

【表4】

表4



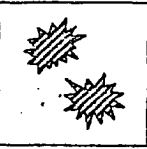
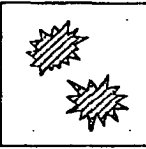
加速電圧	3kV	5kV	10kV	30kV
画像				
コントラスト	1/20	13/20	20/20	20/20
解像度	3/10	8/10	10/10	10/10

表4は、上記の方法でバイオ試料観察の最適加速電圧を判定した表示画面である。この例では、試料透過限界加速電圧が3kV、最適加速電圧が10kVであることが示されている。両者を判定するまでのプロセスは、以下の通りである。まず、バイオ試料をバイオ電子顕微鏡の試料室に導入し視野を決定する。ここでは、注目する微細構造領域の近傍の視野を選択する。次に、電子線の加速電圧を30kVを初期値として徐々に低下させながら電子顕微鏡像を撮影し、画像データを画像解析用コンピュータに記録していく。記録した画像データについて逐次、高速フーリエ変換(FFT)と強度分布解析のソフトを用いて解像度とコントラストの各定量値を求める(表1と同様なデータを得る)。加速電圧30kVのデータと比較して、解像度が3/10、コントラストが1/20になった時に像観察を停止する。その時の加速電圧が試料透過限界加速電圧となる。バイオ試料の試料前処理法に応じて係数 m

を表 3 に示した範囲で選択する(通常は係数 $m=2.5$ を選択)。試料透過限界加速電圧を m 倍して最適加速電圧を得る。その後、注目する微細構造領域に視野を移動して所望の電子顕微鏡像を最適加速電圧で観察し、記録する。極低ダメージな観察が達成される。試料冷却タイプの試料ホルダーを用いると、さらに効果的である。

【 0 0 1 2 】

上記の観察プロセスは、本発明のバイオ電子顕微鏡を用いて自動的に実施できる。図 2 に、本発明のバイオ電子顕微鏡の全体構成図を示す。電子銃 1, コンデンサレンズ 2, スキャンコイル 3, 対物レンズ 4, パルスモーター駆動コンデンサ絞り 1 5 から成る電子線照射系, ビーム位置補正コイル 5, E × B 型エネルギーフィルタ 6, エネルギー選別スリット 7, 電子線検出器 8 から成る結像系, 電子顕微鏡用メッシュトランスファ 9, マイクロ試料前処理装置 1 0, 試料ホルダー 1 1, 任意加速電圧対応レシプサーバ 1 2, 画像・解析データ表示画面 1 3, 装置制御用および画像解析用コンピュータ 1 4 から構成されている。電子顕微鏡像の結像の方式は、従来の走査形透過電子顕微鏡(STEM)と同様である。

【 0 0 1 3 】

試料透過限界加速電圧と最適加速電圧を判定する時に加速電圧を徐々に低下させながら像観察していくが、加速電圧を変更すると照射系や結像系の最適条件も変化する。本発明では、任意の加速電圧における最適条件(電子銃のエミッション電流, コンデンサ絞り位置, 各レンズ励磁電流など)を任意加速電圧対応レシプサーバ 1 2 に記憶しており、像観察時の加速電圧に応じて各条件を最適値に制御する。加速電圧は装置制御用および画像解析用コンピュータ 1 4 によって 30kV を初期値として任意の電圧ステップで自動制御できる。装置制御用および画像解析用コンピュータ 1 4 と任意加速電圧対応レシプサーバ 1 2 は連動している。また、解像度とコントラストの解析ソフトは、電子線検出器 8 からの信号で形成される画像データの入力と解析実行のタイミングが装置制御用および画像解析用コンピュータ 1 4 や任意加速電圧対応レシプサーバ 1 2 からの信号で制御されるので、上記の観察プロセスを自動的に実行できる。

【 0 0 1 4 】

E×B型エネルギーフィルタ6は、凍結切片試料のような無染色試料の高コントラスト観察に用いる。図3(a)はE×B型エネルギーフィルタの構成図を示す。10mm角程度の静電偏向用電極と磁界偏向用磁極から成る小型のものである。バイオ試料を透過した電子線をエネルギーに応じて偏向するので、エネルギー選別スリット7上に電子線のエネルギー分散が得られる。エネルギー選別スリット7で特定のエネルギーを有する電子線のみを通過させると、該エネルギーの電子線のみで結像できる。図3(b)を用いて、エネルギー選別の具体的な例を示す。試料を透過した電子線のエネルギーは V_0 と $V_0 - \Delta V$ の混在であるとする。この時、 $V_0 - \Delta V$ のエネルギーを有する電子線は角度 α だけ偏向される。 α は、

$$\alpha = tV_1 \Delta V / 2dV_0^2 \quad \dots \quad (\text{数式 2})$$

で表される。ここで、 t ：静電偏向電極の高さの1/2、 V_1 ：静電偏向電極の印加電圧、 d ：静電偏向電極の間隔、 V_0 ：試料に入射した電子線のエネルギー、 ΔV ：試料内で損失したエネルギー。また、エネルギー選別スリット7での偏向量 W は、

$$W = \alpha L \quad \dots \quad (\text{数式 3})$$

ここで、 L ：静電偏向電極の中心からエネルギー選別スリット7までの距離。 $t=5$ mm, $V_1=500$ V, $d=8$ mm, $V_0=10$ keV, $\Delta V=250$ eV, $L=185$ mmの時に、 $\alpha=3.91 \times 10^{-4}$ rad. となり、 $W=0.072$ mmとなる。スリット幅 u が0.010 mmであると約35 eVのエネルギー幅に相当し、その値のエネルギー分解能での250 eVエネルギー分布像が得られることになる。この場合、試料包埋樹脂や試料に広範囲に含まれるカーボン(C(280 eV))の影響を取り除けるので、像を高コントラスト化できる。また、Ca(350 eV), N(415 eV), O(520 eV)をスリット内に取り込めば、各元素の分布像が得られ、微細形状のみならず成分元素の解析も可能である。

【 0 0 1 5 】

装置制御用および画像解析用コンピュータ14には、バイオ試料中のウイルスや蛋白質などの種類を同定する画像解析ソフトが搭載されている。解析結果は、画像・解析データ表示画面13に表示される。図4は、該画像解析ソフトを用いてウイルスの種類を特定する画像処理のフローチャートを示す。ウイルスの試料

を観察して得られた像は観察像として装置制御用および画像解析用コンピュータ 1 4 に記録される。該コンピュータには、種類が既知なウイルスの電子顕微鏡像データベースが搭載されている。図 4 に示すように、病原性の各種ウイルスは構造に特徴があり、またサイズや構造は同一種類のウイルス間ではほぼ一定である。そこで、データベースには各種ウイルスの代表的な像(参照像)と、性質や治療法などの関連情報が載せられている。観察像は参照像と比較できるように像倍率やコントラストが調整された後に、データベース中の参照像との類似性を画像処理を用いて定量的に解析される。画像処理法としては、周波数成分を特徴とするパターン認識法や相関法などを用いる。類似性が規定の範囲に入っていれば観察したウイルスの種類と関連情報を表示し、それ以外であれば解析不能であった旨を表示する。これによって、従来は高度な知識と経験が必要であったウイルスの種類同定を、自動的に、かつ観察したその場で実行できるので、病理診断などを高効率化できる。

マイクロ試料前処理装置 1 0 は、極少量の生体組織や糞便などの試料を注入すると、自動的に試料前処理を実行するものである。図 5 にマイクロ試料前処理装置の構成を示す。数 cm 角程度の大きさで、厚さは数 mm のチップ状である。バイオ電子顕微鏡の試料ステージ駆動系部分に着脱する機構になっている。チップ上には、前処理工程を実行するマイクロチャンバ、マイクロポンプ、マイクロ流路などが MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術を用いて形成されている。チップ裏面には電極が付いており、マイクロチャンバ、マイクロポンプ、マイクロ流路などの駆動用電力を試料ステージ駆動系から供給できるようになっている。図 5 は、糞便試料からウイルスを検出するための試料前処理を実行するタイプの装置である。前処理プロセスは、以下のようなものである。まず、水に溶かした糞便を最上流のマイクロチャンバに注入する。マイクロ流路で次プロセスへ移動させる。ホモジネートデバイスでは高速微量遠心を行い、ウイルスが含まれる相を分離する。ウイルス精製デバイスでは更に超高速微量遠心を必要に応じて試薬を注入しながら実施し、夾雑物を除去する。支持膜付き電子顕微鏡用メッシュに精製されたウイルス試料を移動させる。マイクロポンプを用いて染色デバイスからネガティブ染色剤をメッシュ上に供給する。自然乾燥させる。これで、電子顕微鏡観察

可能な状態になるので、メッシュを電子顕微鏡用メッシュトランスファァー 9 により試料ホルダ 1 1 へ載せ換える。電子顕微鏡用メッシュトランスファァー 9 の先端にはメッシュを着脱するピンが付いている。試料ホルダ 1 1 を電子顕微鏡試料室に移動して観察に供する。以上の操作は、装置制御用および画像解析用コンピュータ 1 4 によって制御され、自動的に実施することも可能である。本発明によって、煩雑かつ熟練を要した試料前処理を自動的に実施でき、試料前処理の効率を大幅に向上できる。また、前処理条件を一定にできるので、試料間の精製状態や染色状態を同一レベルにでき、結果として検査や解析の高精度化を達成できる。

【 0 0 1 6 】

【発明の効果】

本発明の実施例の効果は以下の通りである。試料透過限界加速電圧の 1.2~4.2 倍の電子線加速電圧を用いたバイオ試料観察方法により、電子線照射ダメージを従来と比較して大幅低減(~1/10)でき、バイオ構造を高精度で観察できる。また、E×B 型エネルギーフィルタにより、小型かつ低コストな装置構成で無染色試料を高コントラスト観察できる。バイオ試料の観察象とデータベース中の参照像の類似性を画像処理解析する方法により、従来は高度な知識と経験が必要であったウイルスの種類同定を、自動的に、かつ観察したその場で実行できる。電子顕微鏡本体にシステム化できるマイクロ試料前処理装置により、煩雑かつ熟練を要した試料前処理を自動的に実施でき、試料前処理の効率を大幅に向上できる。以上の効果を活用して、病理検査やバイオ微細構造の解析において、高精度化と高スループット化を同時に達成できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明によるバイオ試料観察方法で撮影したアラビドプスの電子顕微鏡像を示す。

【図 2】

本発明によるバイオ電子顕微鏡の全体構成図。

【図 3】

E×B 型エネルギーフィルタの構成図。

【図 4】

ウイルスの種類を特定する画像処理のフローチャート。

【図 5】

マイクロ試料前処理装置の構成図。

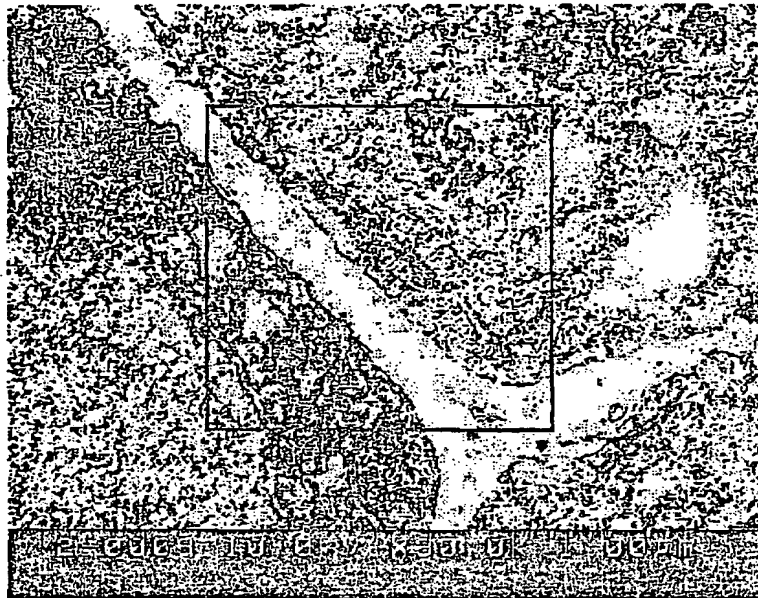
【符号の説明】

1 …電子銃、2 …コンデンサレンズ、3 …スキャンコイル、4 …対物レンズ、5 …ビーム位置補正コイル、6 …E×B型エネルギーフィルタ、7 …エネルギー選別スリット、8 …電子線検出器、9 …電子顕微鏡用メッシュトランスファー、10 …マイクロ試料前処理装置、11 …試料ホルダ、12 …任意加速電圧対応レシピサーバ、13 …画像・解析データ表示画面、14 …装置制御用および画像解析用コンピュータ、15 …パルスモーター駆動コンデンサ絞り。

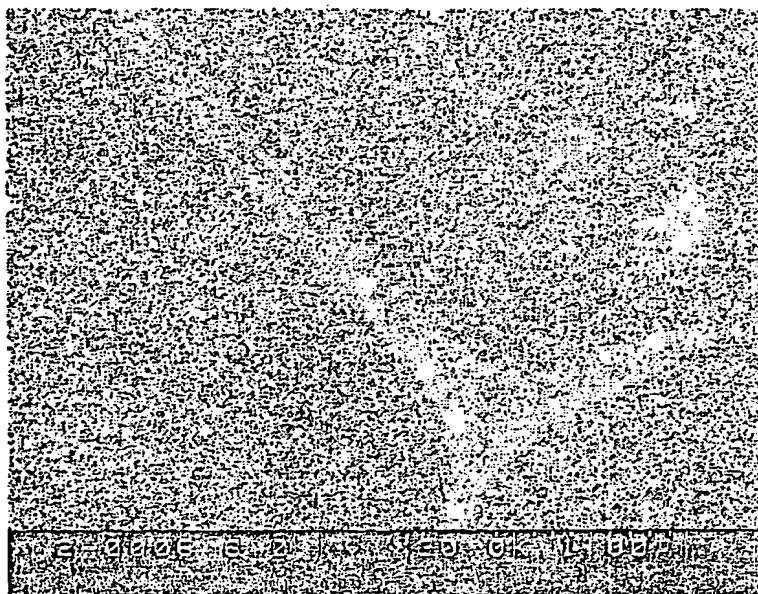
【書類名】 図面

【図1】

図1

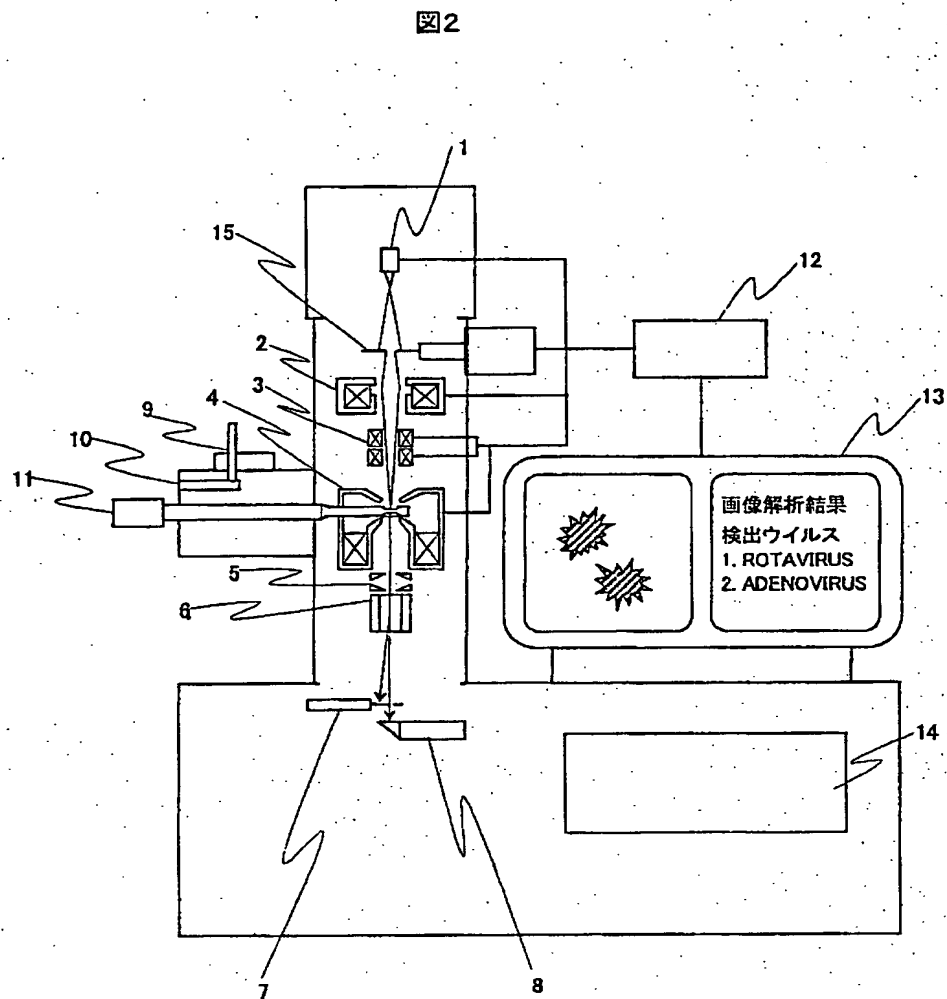


(a) 電子線加速電圧:10kV

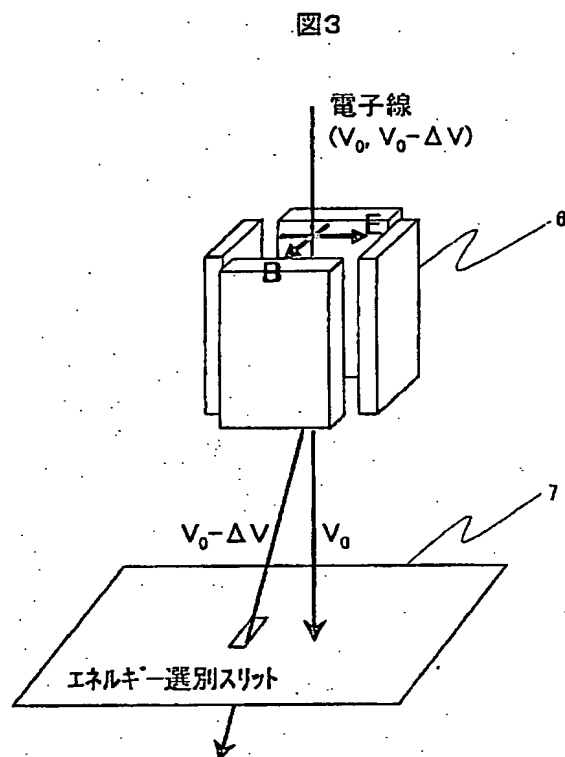


(b) 電子線加速電圧:3kV

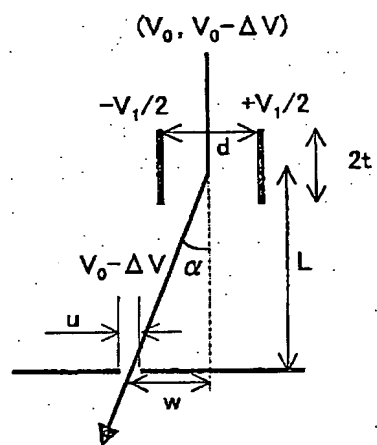
【図2】



【図3】



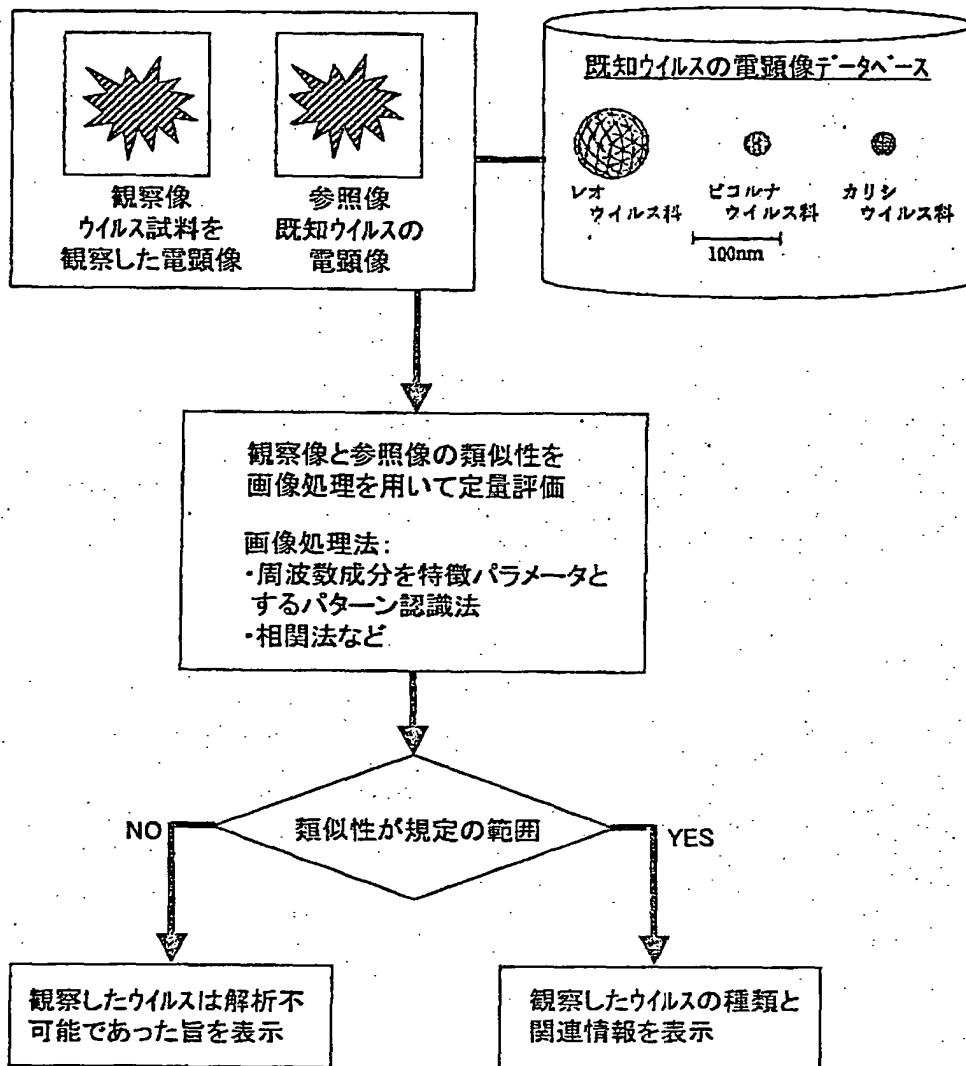
(a)



(b)

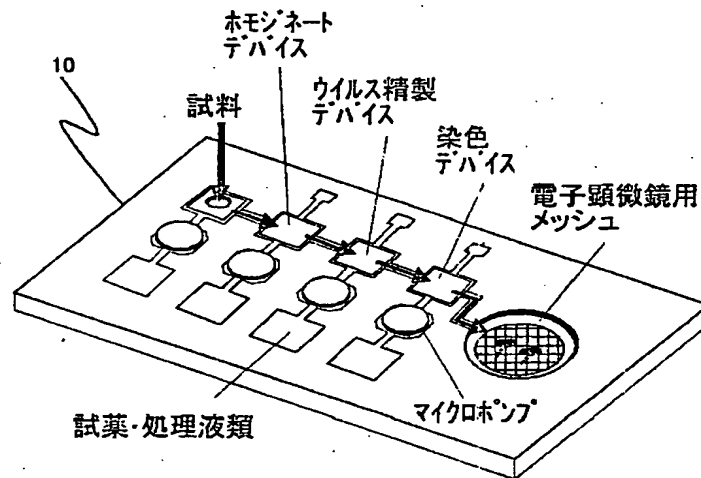
【図 4】

図4



【図5】

図5



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 バイオ試料を低ダメージ、高コントラストで観察し、高精度な像解析を行い、かつ高スループットな試料前処理を行うバイオ電子顕微鏡及び観察方法を実現することを課題とする。

【解決手段】 1) 所定の条件下で求めた電子線の試料透過限界加速電圧の1.2～4.2倍の加速電圧で観察する。 2) 小型簡易構造のE×B型エネルギーフィルタを試料と電子線検出器の間に設け、試料を透過した電子線のうち特定エネルギー領域にある電子線で結像する。 3) 試料中のウイルスや蛋白質などの観察像と既知のウイルスや蛋白質などの参照像の類似性を画像処理で定量解析する。 4) バイオ試料の前処理プロトコルをMEMS技術を用いてチップ化し、電子顕微鏡の試料ステージ部分に搭載し、試料導入から前処理、試料ホルダ上への輸送までを行う。

【選択図】 図2

認 定 ・ 付 加 情 報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 0 0 2 7 2 4
受付番号	5 0 3 0 0 0 2 1 2 7 8
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0 0 9 0
作成日	平成 1 5 年 1 月 1 0 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成15年 1月 9日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005108]

1. 変更年月日 1990年 8月31日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地
氏 名 株式会社日立製作所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 1 3 8 7 8 3 9]

1. 変更年月日	2 0 0 1 年 1 0 月 3 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都港区西新橋一丁目 2 4 番 1 4 号
氏 名	株式会社日立ハイテクノロジーズ